بسم الله الرحمن الرحیم

کتابخانه دانشکده پزشکی
شماره ثبت: ۱۰۳۸۳
تاریخ ثبت: ۲۴/۵/۱۳۹۵

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اصفهان
دانشکده پزشکی

مقاله جهت اخذ درجه دکترای حرفه ای پزشکی

عنوان مقاله

بروز مقایسه ای پروتئین مهارکننده تومور BRCA 1 درنمونه های سرطانی وسالم کولورکتال

شماره طرح :

۲۹۲۱۶۲

نگارش:

وحید کاشانیان

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر مهدی نیکبخت دستجردی
(دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)

آبان ماه ۱۳۹۴

دانشکده پزشکی

بسمه تعالی

صورتجلسه هیات داوران پایان نامه دکترای عمومی

جلسه دفاع از پایان نامه تحقیقاتی آقای دکتر وحید کاشانیان

تحت عنوان: بروز مقایسه ای پروتئین مهار کننده تومور BACA1 در نمونه های سرطانی و سالم کولورکتال

برای دریافت درجه دکترای عمومی رشته پزشکی در تاریخ ۹۴/۸/۱۷ با حضور امضاء کنندگان زیر تشکیل شد و مورد تصویب قرار گرفت.

اساتید راهنما: دکتر مهدی نیکبخت

معاون پژوهشی گروه: دکتر شهناز رضوی

مدیر گروه: دکتر ابراهیم اسفندیاری

نماینده معاونت پژوهشی دانشکده: دکتر نگاه توکلی فرد

مشاور آماری:

اعضای هیات داوران:

۱- دکتر روشنک ابوترابی

۲- دکتر غلامرضا دشتی

۳-دکتر فرهاد گلشن ایرانپور

۴- دکتر رشیدی

۵- دکتر رضوی

۶- دکتر توکلی فرد

این قسمت توسط حوزه معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی تکمیل می شود:

پایان نامه فوق در تاریخ ۹۴/۸/۲۳ در حوزه معاونت پژوهشی دانشکده با نمره ۱۹/۷۵ (بر مبنای ۲۰) نوزده و هفتاد و پنج صدم

و درجه .... مورد تائید قرار گرفت.

معاون پژوهشی دانشکده پزشکی

دانشکده پزشکی

بسمه تعالی

شماره : د/۸/۱۲۸۶۱

تاریخ : ۱۳۹۴/۰۸/۲۰

پیوست : ندارد

پس از حمد خدا و درود و صلوات بر محمد و آل محمد(ص)

گواهی پذیرش چاپ مقاله

با سلام و احترام

بدینوسیله به استحضار می رساند مقاله تحت عنوان:
«بررسی مقایسه ای بروزپروتئین مهارکننده تومور BRCA1 درنمونه های سرطانی وسالم کولو رکتال توسط روش ایمونوهیستوشیمی»
به شماره ۵۷۳۳ و به نویسندگی« مهدی نیکبخت دستجردی و وحید کاشانیان» و نویسنده مسئول ، مهدی نیکبخت دستجردی در جلسه شورای نویسندگان مورد بررسی قرار گرفت و با چاپ آن در قالب مقاله پژوهشی (Original) موافقت گردید.

دکتر مجید برکتین
سردبیر مجله
دانشکده پزشکی

بروز مقایسه ای پروتئین مهار کننده تومور BRCA 1 درنمونه های سرطانی وسالم کولورکتال

مهدی نیکبخت دستجردی Ph.D* وحید کاشانیان**

*دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی

**دانشجوی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ، دانشکده پزشکی،

نویسنده مسئول: دکتر مهدی نیکبخت دستجردی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی. تلفن ۰۳۱۱-۷۹۲۲۴۰۳ همراه:۰۹۱۳۱۰۴۶۷۴۷ نما بر: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۵۱۷

nikbakht@med.mui.ac.ir

چکیده:

مقدمه: ژن های مهار کننده ی تومور متفاوتی در سرطان کولورکتال نقش دارند که از این بین نقش ژن مهار کننده ی تومور BRCA1 مهم و قابل بررسی می باشد. عملکرد بیولوژیکال BRCA 1 درسرطان شناخته شده است و اهمیت پروگنوستیک آن درسرطان کولورکتال تصدیق شده است به طوریکه کاهش بیان این پروتئین درسرطان نشانگر پیشاگهی ضعیف برای بیماران می باشد دراین تحقیق برآن شدیم تا بیان پروتئین BRCA1 را درنمونه های سرطانی کولورکتال درمقایسه با بافت نرمال مجاور تومور ازطریق روش ایمونوهسیتوشیمی بررسی نماییم .

مواد و روش: در این مطالعه تعداد ۵۰ نمونه سرطانی کولورکتال وبافت سالم مجاور تومور جمع آوری شد. بیان پروتئین BRCA۱ با روش ایمونوهیستوشیمی بر روی مقاطع پارافینی بررسی گردید. ارتباط بین بروز پروتئین با ویژگی های کلینیکوپاتولوژیک بررسی شد. سن ، جنس و ویژگی های کلینیکوپاتولوژیک مورد توجه قرار گرفت.

نتایج: این مطالعه نشان داد که میزان بروز پروتئین BRCA1 در نمونه های سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور آنها به طور معنی داری کاهش یافته است ($P= ۰/۰۲۶$). بروزپروتئین BRCA 1 با *Grade* توموردارای ارتباط معنی دارآماری بود.

نتیجه گیری: پروتئین BRCA۱ می تواند به عنوان یک مارکر بیولوژیک مناسب در تشخیص و به عنوان یک عامل پیش آگهی دهنده در سرطان کولورکتال استفاده گردد.

واژه های کلیدی: سرطان کولورکتال، ایمونوهیستوشیمی، BRCA۱ ، ژن مهار کننده ی تومور

مقدمه

سرطان کولورکتال (colorectal cancer) یکی ازسرطانهای خطرناک درانسان می باشد به نحوی که درمیان چهارسرطان شایع منجربه مرگ قرارمی گیرد. باوجودپیشرفتهای انجام شده درتشخیص ودرمان بیماری، بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ اغلب دچارعود موضعی و درمراحل انتهایی بیماری دچار متاستاز به غدد لنفاوی، کبد و ریه می شوند که به طورچشمگیری میزان بقای ۵ ساله بیماران راکاهش می دهد. با نوجه به اهمبت موضوع انجام تحقیقات بیشتر جهت بررسی مکانیزم و پیشرفت سرطان روده بزرگ و همچنین پیداکردن بیومارکرهای بالقوه جهت تشخیص سریعتر و بررسی مناسب پروگنوز سرطان کولورکتال ضروری می باشد(۱-۴).

درسال ۱۹۹۰،ژن BRCA 1 به عنوان یک ژن مهارکننده توموردر ارتباط با سرطان پستان کشف شد.این ژن برروی بازوی بلندکروموزوم شماره ۱۷ واقع شده است و نوعی فسفوپروتئین هسته ای را کد می کند که درحفظ ثبات ژنومی ، کنترل تکثیرسلولی، ترمیم DNA و القاء آپوپتوز نقش دارد. یکی ازعلل بروز سرطان عدم بیان ژن مهارکننده ی تومورBRCA 1 به علت تغییر در وضعیت متیلیشن پروموتر آنها می باشد. عملکرد بیولوژیکال BRCA 1 درسرطان شناخته شده است و اهمیت پروگنوستیک آن درسرطان کولورکتال تصدیق شده است به طوریکه کاهش بیان این پروتئین درسرطان نشانگر پیشاگهی ضعیف برای بیماران می باشد (۵و۶).

ایمونوهیستوشیمی (IHC) یک تکنیک آسان وارزان ودردسترس می باشد که به عنوان یک تست روتین برای غربالگری دربیماری های ژنتیکی مانند سندرم لینچ در سرطان روده بزرگ، و اخیرا،

سرطان آندومتر استفاده می شود (۷و۸). یک مطالعه بزرگ نشان داد که غربالگری با IHC برای جهش های ژنتیکی پس ازانجام تستهای تاییدی مانند آنالیز جهش و یا بررسی هایپرمتیلاسیون، مقرون به صرفه ترین روش برای ارزیابی وتشخیص بیماران مبتلا به سندرم لینچ است (۹).

با توجه به مطالب ذکرشده درمورد اهمیت این پروتئین و نیز باتوجه به اینکه سرطان کولورکتال یکی از شایعترین سرطان ها بوده وتعیین پیش آگهی این بیماران اهمیت فراوانی در امر درمان و تعیین مدت بقاء آنها دارد. دراین تحقیق برآن شدیم تا بیان این پروتئین را درنمونه های سرطانی کولورکتال درمقایسه با بافت نرمال مجاور تومور ازطریق روش ایمونوهسیتوشیمی بررسی کنیم .

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها:

دراین مطالعه تعداد ۵۰ نمونه سرطانی کولورکتال و ۵۰ نمونه بافت سالم مجاور تومور جمع آوری شدند. نمونه ها بصورت بلوک پارافینی آماده، ازبخش پاتولوژی بیمارستان الزهراء اصفهان تهیه گردیدند. برای این کار با حفظ اصول اخلاقی و مشخصات بیماران، به بررسی پرونده های موجود درآرشیو بیمارستان الزهرای اصفهان پرداخته و پس از یافتن افراد مبتلا، سن و شماره پاتولوژی آنها نوشته شد، سپس لام ها وبلوک های آنها از انبار مربوطه یافت گردید. سپس به کمک پاتولوژیست لام های سالم ازسرطانی افتراق داده شد و اطلاعات کلینیکی- پاتولوژیکی نمونه های جمع آوری شده یادداشت گردید .

تهیه لام ایمونوهیستوشیمی:

پس ازتائید تشخیص پاتولوژی نمونه ها توسط رنگ آمیزی H&E، به ترتیب مراحل زیر جهت تهیه لام ایمونوهیستوشیمی انجام گرفتند:

۱) آماده سازی بافت: ابتدا نمونه ها توسط اتانول صعودی (۷۰٪،۹۵٪،۹۹٪) آبگیری شدند. پس از آن توسط گزیلن شفاف سازی شده و در انتها توسط پارافین قالبگیری گردیدند.

۲) برش گیری : دراین مرحله، برش های بافتی به ضخامت ۴-۵ میکرون تهیه شد.

۳) رنگ آمیزی ایمونوهستوشیمی: دراین مرحله، نمونه ها با غوطه ورسازی درگزیلل، پارافین زدایی شدند، سپس توسط اتانول های نزولی (۹۹٪ ،۹۵٪ ،۷۰٪) آبدهی صورت گرفت. در مرحله

بعد به منظور توقف فعالیت Endogenous peroxide برشها به مدت ۱۰ دقیقه درمجاورت پراکسیدهیدروژن ۵٪ درصد انکوبه شدند. پس از آن در آب جاری شستشو داده شد . درمرحله ی بعد به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۸ درجه در بافر ۰/۰۱ مولار سیترات سدیم دریک اون میکروویو، Antigen retrieval انجام گرفت. پس از انجام مراحل ذکر شده ، فعالیت Endogenous peroxide توسط سرم نرمال (۱۰٪ goat) در TBS به مدت پنج دقیقه متوقف و در مرحله ی بعد سرم اضافی برداشت گردید وآنتی بادی اولیه [monoclonal antibody against BRCA1 (ab-1) clone ms110 (mab) from culbiochem(Merk,cat.NO OP92)] با رقت ۱:۲۰۰ به مدت یک ساعت در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد اضافه شد. مراحل بعدی، شامل دو بار شستشو با TBS ، هر بار به مدت پنج دقیقه، انکوبه کردن با آنتی بادی ثانویه[HRP anti-mouse antibody (dako,Copenhagen,benmark)] با رقت ۱:۵۰۰ به مدت چهل وپنج دقیقه و مجددا دوبار شستشو با TBS ، هربار پنج دقیقه بود. همچنین واکنش کروموژنیک توسط diaminobenzidine انجام شد، رنگ آمیزی مخالف نیز با Hematoxilin انجام شد. رنگ قهوه ای رنگ نشان دهنده بروز پروتئین و رنگ آبی نشان دهنده عدم بروز پروتئین BRCA1 در سلول ها می باشد. در آخرنمونه ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند. در گروه های کنترل منفی از PBS به جای آنتی بادی های اختصاصی استفاده شد.

بررسی میکروسکوپیک مقاطع نشاندار شده با آنتی بادی:

مقاطع نشاندار شده با آنتی بادی به منظوربررسی میکروسکوپیک با استفاده ازمیکروسکوپ نوری و بکارگیری نرم افزار Motic Advance Plus۲ در ۱۰ محدوده متفاوت تصویربرداری شدند. پس از آن جهت بررسی کمی از مانیتور LCD استفاده گردید. در این بررسی، حداقل ۱۰۰ سلول رنگ آمیزی شده در هر محدوده از لام و در مجموع حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش گردید(در هر لام سلول ها در ۱۰ محدوده شمارش گردید). شمارش سلول های رنگ آمیزی شده بدون اطلاع قبلی ازهویت نمونه ها، توسط دو نفر انجام گرفت. و پس از آن درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به رنگ قهوه‌ای نسبت به کل سلول‌ها در هر لام مشخص و بر این اساس نمونه‌های سرطانی و سالم به سه گروه تقسیم شدند:

۱)گروه + که درصد سلول‌های قهوه‌ای به آبی (میزان بروز پروتئین) در آن‌ها ۵ تا ۲۵ درصد بود

۲) گروه ++ که درصد سلول‌های قهوه‌ای به آبی (میزان بروز پروتئین) در آن‌ها ۲۵ تا ۷۵ درصد بود

۳) گروه +++ که درصد سلول‌های قهوه‌ای به آبی (میزان بروز پروتئین) در آن‌ها ۷۵ تا ۱۰۰ درصد بود

پس از این مرحله تعداد نمونه ها در هر یک از سه گروه فوق الذکر شمارش شده و مطابق جدول ۲ مقدار P بر اساس مقایسه مجموعه نمونه های + و ++ در مقابل نمونه های +++ در دو گروه سرطانی و سالم از طریق Chi-squared test مشخص گردید. P-Valve کوچکتراز ۰/۰۵

معنی دار تلقی گردید(نرم افزار نرم افزار ۱۶ SPSS).تجزیه و تحلیل اطلاعات:مقایسه بین نمونه های سرطانی و سالم و نیزارتباط بین بروز پروتئین با نوع ؛ محل و Gradeتومور و ارتباط بین بروز پروتئین با سن و جنس بیمار ازطریق Chi-squared test مشخص گردید. در صورت فراهم نبودن شرایط Chi-squared test از Fisher exact test استفاده شد. P-Valve کوچکتر از ۰۵/. معنی دار تلقی گردید.

نتایج

در این مطالعه تعداد ۵۰ نمونه ی سرطان کولورکتال به عنوان گروه آزمایش و ۵۰ نمونه از بافت سالم مجاور همان نمونه های تومور به عنوان گروه شاهد استفاده گردید. خصوصیات دموگرافیک نمونه‌های سرطانی که شامل سن، جنس، محل تومور و نوع تومور می‌باشد در جدول ۱ ثبت شده است.

بعد از مراحل آماده سازی بافت و رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، تمامی نمونه ها مورد تأیید پاتولوژی نیز قرار گرفتند. در شکل شماره ۱ نمونه بافت سرطانی کولورکتال مشاهده می شود که در آن بخش اعظم سلول ها به رنگ آبی می باشند. همچنین در شکل شماره ۲ نمونه بافت سالم کولورکتال مشاهده می شود که در آن بخش اعظم سلول ها به رنگ قهوه ای در آمده اند.

نتائج شمارش سلولی لام های رنگ آمیزی شده توسط ایمونوهیستوشیمی:

برای ارزیابی پروتئین BRCA1 پس از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، در ۱۰ محدوده تصویربرداری در مجموع حداقل ۱۰۰۰ سلول در هر لام شمارش گردید و درصد سلول هایی که رنگ قهوه ای گرفته بودند، تعیین شد. همچنین درصد سلول هایی که رنگ قهوه ای نداشتند (رنگ آبی)، نیز محاسبه گردید. پس از آن درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به رنگ قهوه‌ای نسبت به کل سلول‌هادر هر بافت مشخص و بر این اساس نمونه‌های سرطانی و سالم به سه گروه تقسیم شدند. نتائج این مطالعه نشان داد که میزان بروز پروتئین BRCA1 در نمونه های سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور آنها به طور معنی داری کاهش یافته است ($P=$ ۰/۰۲۶)(جدول ۲).

نتائج ارتباط بروز پروتیین *BRCA1* با نوع تومور

از ۵۰ نمونه مورد مطالعه، تعداد ۸ نمونه از نوع آدنو کاسینومای موسینی و مابقی نمونه ها از نوع آدنو کاسینومای غیر موسینی بودند. در مورد بروز بروز پروتیین BRCA1 از بین نمونه های آدنو کاسینومای غیر موسینی، تعداد ۱۴ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۱۸ نمونه در گروه(++) و تعداد ۱۰ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. از بین نمونه های آدنو کاسینومای موسینی نیز تعداد ۲ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۳ نمونه در گروه(++) و تعداد ۳ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. اختلاف بروز پروتئین BRCA1 بین این دو نوع تومور معنی دار نبود(P= 1.000) [جدول۳]

نتائج ارتباط بروز پروتیین با محل تومور

از ۵۰ نمونه مورد مطالعه، تعداد ۳۶ نمونه مربوط به ناحیه کولون(پروگزیمال) و تعداد ۱۴ نمونه مربوط به ناحیه رکتوم و سیگموئید(دیستال) بودند. در مورد بروز بروز پروتیین BRCA1 از بین نمونه های متعلق به ناحیه کولون ، تعداد ۱۳ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۱۴ نمونه در گروه(++) و تعداد ۹ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. از بین نمونه های متعلق به ناحیه رکتوسیگموئید نیز تعداد ۳ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۷ نمونه در گروه(++) و تعداد ۴ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. اختلاف بروز پروتئین بین تومور های این دو ناحیه معنی دار نبود(P= 0.50).

[جدول۴].

نتائج ارتباط بروز پروتیین با جنس بیمار

از ۵۰ نمونه مورد مطالعه تعداد ۳۳ نمونه متعلق به جنس مرد و تعداد ۱۷ نمونه متعلق به جنس زن بود. در مورد بروز بروز پروتیین BRCA1 از بین نمونه های متعلق به جنس مرد ، تعداد ۱۲ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۱۴ نمونه در گروه(++) و تعداد ۷ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. از بین نمونه های متعلق به جنس زن نیز تعداد ۴ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۷ نمونه در گروه(++) و تعداد ۶ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. اختلاف بروز پروتئین بین تومور ها در دو جنس معنی دار نبود(P= 0.84)[جدول۵].

نتائج ارتباط بروز پروتیین با سن بیمار

از ۵۰ نمونه مورد مطالعه تعداد ۱۸ نمونه در دامنه سنی برابر یا کمتر از ۵۹ سال و تعداد ۳۲ نمونه نیز در دامنه سنی برابر یا بیشتر از ۶۰ سال قرار داشتند. در مورد بروز بروز پروتیین BRCA1 از بین نمونه های متعلق به دامنه سنی برابر یا کمتر از ۵۹ سال ، تعداد ۸ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۵ نمونه در گروه(++) و تعداد ۵ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. از بین نمونه های متعلق دامنه سنی برابر یا بیشتر از ۶۰ سال نیز تعداد ۸ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۱۶ نمونه در گروه(++) و تعداد ۸ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. اختلاف بروز پروتئین بین تومور ها در دو جنس معنی دار نبود(P=2)[جدول۶].

نتائج ارتباط بروز پروتیین با *grade* تومور

از ۵۰ نمونه آدنو کارسینومای مورد مطالعه، تعداد ۳۱ نمونه دارای grade1 ، تعداد ۱۴ نمونه دارای grade2 وتعداد ۵ نمونه دارای grade3 بودند . در مورد بروز بروز پروتیین BRCA1 از بین نمونه های دارای grade1 ، تعداد ۱۴ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۱۴ نمونه در گروه(++) و تعداد ۳ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. از بین نمونه های دارای grade2 تعداد ۱ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۶ نمونه در گروه(++) و تعداد ۷ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. از بین نمونه های grade3 تعداد ۱ نمونه در گروه (+++)، تعداد ۱ نمونه در گروه(++) و تعداد ۳ نمونه نیز در گروه (+) جای گرفتند. اختلاف بروز پروتئین بین نمونه های دارای grade1 و نمونه های دارای grade2,3 معنی دار بود(P= 0.013)[جدول۷].

بحث

سرطان کولورکتال یک بیماری خطرناک و کشنده و در عین حال قابل پیشگیری می باشد که همواره مورد توجه محققین در مراکز تحقیقاتی سراسر دنیا بوده است. این سرطان جزو سه سرطان شایع در دنیا می باشد (۱۰). ژن های مهار کننده ی تومور زیادی در سرطان کولورکتال نقش دارند که از این بین، نقش و جایگاه ژن مهار کننده ی تومور BRCA1 قابل توجه و بررسی می باشد. BRCA1 به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور می باشد که فقدان آن منجر به آسیب های زیادی در ژنوم می شود. بنابراین تغییرات در بیان این ژن موجب آسیب پذیری سلول های بدن از جمله سلول های قسمت کولورکتال نسبت به انکوژن ها می شود (۱۱).

بیان این پروتئین در بعضی از انواع سرطان ها نظیر سرطان سینه، تخمدان و همچنین سرطان های مربوط به دستگاه گوارش مثل سرطان کولورکتال کاهش می یابد. مطالعه ما نشان داد که میزان بروز پروتئین BRCA1 در نمونه های سرطانی بیماران مبتلا به سرطال کولورکتال نسبت به بافت سالم مجاور آنها به طور معنی داری کاهش دارد. همچنین ما نشان دادیم که کاهش سطح بروز BRCA1 در تومور های با gradeپیشرفته دارای اختلاف معنی داری نسبت به سایر نمونه ها می باشد که نمایانگر آن است که باتوجه به آنکه BRCA1می تواند رشد و تهاجم تومور را مهار نماید ،کاهش سطح بروز BRCA1 ممکن است درجه بدخیمی را در کارسینومای کولورکتال افزایش دهد و پیش آگهی ضعیفتری را برای بیمار ارائه نماید. بنابراین BRCA1 می تواند در یکی از مسیر های عمده رشد تومور در سرطان کولورکتال انسانی نقش ایفا کند.

در مطالعات مربوط به ژنهای مهار کننده با توجه به اینکه این ژنها عموما در آپوپتوز سلولی ناشی از نقص DNA فعال هستند و سلولهای معیوب را از چرخه سلولی خارج می نمایند، عواملی که بیان این ژنها را کاهش می دهند می توانند باعث پیشرفت تومر از مراحل و درجات اولیه به مراحل و درجات پیشرفته شوند و بدین ترتیب می توانند به عنوان یک مارکر برای تعیین پیش آگهی مد نظر باشند و بنابراین در تومرهای با درجه بدخیمی بیشتر انتظار میرود که کاهش بیان پروتئین بیشتر باشد. در این مطالعه نیز کاهش بروز پروتئین در نمونه های با Grade پیشرفته بیشتر مشاهده شده است.

مطالعات متعددی توسط محققین صورت گرفته که در آن کاهش میزان بروز پروتئین BRCA1 را در بعضی از انواع سرطان ها از جمله سرطان کولورکتال نشان می دهد. در مطالعه ای که توسط yuanming و همکاران بر روی ۱۲۰ کودک مبتلا به سرطان کولورکتال انجام گرفت، نشان داده شد که میزان بیان بیان ژن BRCA1 با متاستازهای سرطان کولورکتال ارتباط معکوس دارد. همچنین نتایج وی نشان داد که BRCA1 در این بیماران می تواند به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص متاستاز به گره های لنفاوی عمل نماید. در نهایت گزارش نمود که کاهش بیان ژن BRCA1 در بیماران مبتلا به سرطان های کولورکتال نشانه پیش آگهی ضعیف می باشد(۱۲).

در مطالعه ی Grabsch و همکارانْ گزارش شد که الگوی بیان ژن BRCA1 پیش بینی کننده میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال می باشد. همچنین گزارش شد که میزان پایین بیان ژن BRCA1 با فقدان بیان ژن های MLH1 و MSH2 مرتبط می باشد (۱۳).

Yu و همکاران بیان نمودند که سطح بیان ژن BRCA1 می تواند در انتخاب رژیم های شیمی درمانی و ارزیابی پیش آگهی برای بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ مفید باشد. همچنین بیان نمودند که سطح بیان ژن BRCA1 در این بیماران پایین تر از افراد سالم می باشد (۱۴).

Narod و همکاران گزارش نمودند که خطر ابتلا به سرطان کولورکتال در زنان زیر سن ۵۰ سال که دارای ژن جهش یافته BRCA1 هستند نسبت به افراد فاقد این جهش به طور معناداری بیشتر می باشد (۱۵).

گزارش شده است که کاهش بروز برخی از ژنهای مهارکننده با جنس بیماران مبتلا به کارسینومای ریه مرتبط می باشد به طوری که نمونه های مذکر بیش از نمونه های مونث دچار کاهش بروز شده اند. به علاوه پیش آگهی کاهش بروز در دو جنس متفاوت گزارش شده است(۱۶).در حالیکه در مطالعه ما ارتباط معنی داری بین دو جنس در کاهش بروز BRCA1 در نمونهای سرطانی کولورکتال مشاهده نشد که تفاوت مطالعه ما با این مطالعه می تواند مربوط به نوع تومور های مورد مطالعه باشد.

در مطالعه ما کاهش سطح بروز BRCA1 در تومورهای ناحیه رکتوسیگموئید دارای اختلاف معنی داری نسبت به تومورهای ناحیه کولون نبود. در مورد کاهش بروز این پروتئین در نواحی

مختلف روده بزرگ تا کنون گزارشی ارائه نشده است ولی در مورد سایر پروتئین های مهار کننده تومور مثل پروتئین PTEN مطالعات متعددی انجام گرفته است. Rychahou و همکارانش(۱۷) و همچنین Colakoglu و همکارانش (۱۸)اخیرا کاهش بیان پروتئین PTENرا در نمونه های سرطانی ناحیه دیستال یافتند.در حالی که Jang و همکارانش (۱۹) کاهش بروز پروتئین PTEN را عمدتا در تو مور های ناحیه کولون (پروگزیمال)یافتند. این یافته ها ممکن است با مکانیسم های ژنتیکی مختلفی که در سرطان زائی نوع اسپورادیک نواحی پروگزیمال و دیستال کولورکتال دخالت دارد مرتبط باشد. یک مکانیسم عبارت است از ناپایداری کروموزومی که مربوط به سرطانهای ناحیه دیستال کولون می باشد و مکانیسم دیگر ناپایداری میکروساتلیت است که در سرطان زائی ناحیه پروگزیمال کولون نقش ایفا می نماید.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج ارایه شده در این تحقیق می توان گفت که کاهش بیان ژن BRCA1 و به دنبال آن کاهش بروز پروتئین مربوطه، ممکن است نقش مهمی در پیدایش سرطان کولورکتال داشته باشد و بنابراین از این پروتئین می توان به عنوان یک مارکر تشخیصی و به عنوان یک عامل پیش آگهی دهنده در سرطان کولورکتال استفاده نمود.

تشکر و قدر دانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوئی با کد ۲۹۲۱۶۲ مصوب شورای طرح های تحقیقاتی دانشکده پزشکی اصفهان می باشد. از کلیه پرسنل محترم معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی، تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

1. Thomas DS, Fourkala EO, Apostolidou S, Gunu R, Ryan A, Jacobs I, Menon U, Alderton W, Gentry-Maharaj A, Timms JF. Evaluation of serum CEA, CYFRA21-1 and CA125 for the early detection of colorectal cancer using longitudinal preclinical samples. Br J Cancer. 2015;113(2):268-274.

2. Ling Y, Yang L, Huang H, Hu X, Zhao C, Huang H, Ying Y. Prognostic Significance of Statin Use in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Medicine (Baltimore). 2015;94(25):e908.

3. Pickhardt PJ. Colorectal carcinoma: what should the oncologist recommend for screening? Semin Oncol. 2015;42(3):359-361.

4. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Genomic testing in colorectal cancer: how much is enough? Oncology (Williston Park). 2015 Mar;29(3):186-188.

5. Tang J, Xi S, Wang G, Wang B, Yan S, Wu Y, Sang Y, Wu W, Zhang R, Kang T.Prognostic significance of BRCA1-associated protein 1 in colorectal cancer.Med Oncol.2013;30(2):541.

6 . Quann K, Jing Y, Rigoutsos I. Post-transcriptional regulation of BRCA1 through its coding sequence by the miR-15/107 group of miRNAs. Front Genet. 2015;6:242.

7. Kwon JS, Scott JL, Gilks CB, et al. Testing women with endometrial cancer to detect Lynchsyndrome. J ClinOncol.2011; 29:2247–2252.

8. Garg K, Levine DA, Olvera N, Dao F, Bisogna M, Secord AA, Berchuck A, Cerami E, Schultz N, Soslow RA. BRCA1 immunohistochemistry in a molecularly characterized cohort of ovarian high-grade serous carcinomas.Am J SurgPathol. 2013;37(1):138-146.

9. Resnick K, Straughn JM Jr, Backes F, et al. Lynch syndrome screening strategies among newlydiagnosed endometrial cancer patients. Obstet Gynecol. 2009; 114:530–536.

10. Samadaian N, Modaresi MH, Mobasheri M, Ebrahim Zadeh Vesal R, Akrami SM. miRNA-21 expression analysis in 35 colorectal cancer. Tehran University Medical Journal, 2014; 72(5): 301-306 .

11. Davarnia B, Mehdipour P, Arei M, Hosseini-Asl SS. The Association Between BRCA1 Expression and Breast Cancer Tumorogenesis. J Ardabil Univ Med Sci. 2012; 12(2):132-139. (Full Text in Persain)

12. Yuanming L, Lineng Z, Baorong S, Junjie P, Sanjun C. BRCA1 and ERCC1 mRNA levels are associated with lymph node metastasis in Chinese patients with colorectal cancer. BMC Cancer. 2013;13:103.

13. Grabsch H, Dattani M, Barker L, Maughan N, Maude K, Hansen O, Gabbert HE, Quirke P, Mueller W. Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2006;12(5):1494-1500.

14. Guanghui X, Yu L, Yi L. Relationship between BRCA1 Expression and Efficacy of Platinum-based Chemotherapy in Colorectal Cancer . Journal of International Translational Medicine 2014; 2(1): 240-244.

15. Phelan CM, Iqbal J, Lynch HT, Lubinski J, Gronwald J, Moller P, Ghadirian P, Foulkes WD, Armel S, Eisen A, Neuhausen SL, Senter L, Singer CF, Ainsworth P, Kim-Sing C, Tung N, Llacuachaqui M, Chornokur G, Ping S, Narod SA; Hereditary Breast Cancer Study Group. Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. Br J Cancer. 2014;110(2):530-534.

16. Goto A, Niki T, Chi-Pin L, Matsubara D, Murakami Y, Funata N, Fukayama M. Loss of TSLC1 expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, sex and prognostic significance. Cancer Sci. 2005;96(8):480-6.

17. Rychahou PG, Jackson NL, Silva SR, et al. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway. Therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. Ann Surg. 2006; 243:833– 44.

18.Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Ezer A, Noyan T, Karakayali H, Haberal M. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? Am J Surg. 2008; 195(6):719-25.

19.Jang KS, Song YS, Jang SH, Min KW, Na W, Jang SM, Jun YJ, Lee KH, Choi D, Paik SS. Clinicopathological significance of nuclear PTEN expression in colorectal adenocarcinoma. Histopathology. 2010; 56(2):229-39.

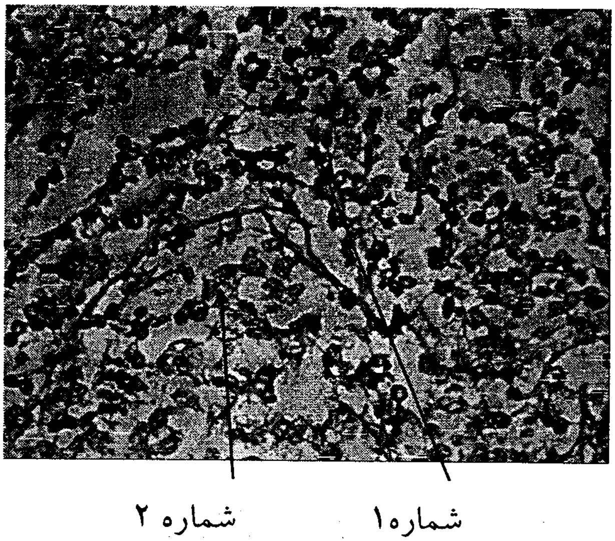
جدول ۱. مشخصات دموگرافیک ۵۰ نمونه‌ی مبتلا به سرطان آدنوکارسینومای کولورکتال

متغیر		تعداد
جنس	مرد	۳۳
	زن	۱۷
سن	≥ ۶۰	۳۲
	≤ ۵۹	۱۸
نوع تومر	آدنوکارسینومای موسینی	۸
	آدنوکارسینومای غیرموسینی	۴۲
Grade	G1	۳۱
	G2	۱۴
	G3	۵
محل	کولون	۳۶
	رکتوسیگموید	۱۴

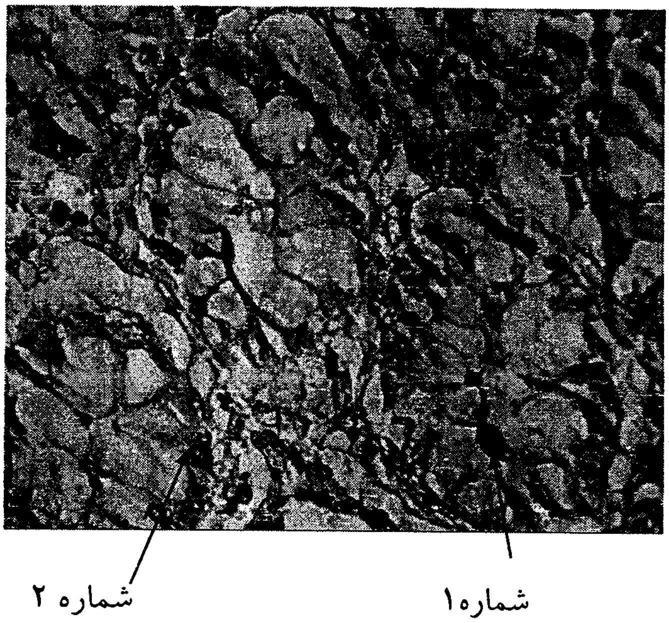
جدول ۲. مقایسه‌ی بروز پروتئین BRCA1 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال با بافت سالم مجاور (مارژین)

متغیر		گروه		مقدار P
		تومور (درصد) تعداد	بافت سالم (درصد) تعداد	
نمونه ها	+	۱۳ (۲۶)	۸ (۱۶)	۰/۰۲۶ *
	++	۲۱ (۴۲)	۱۵ (۳۰)	
	+++	۱۶(۳۲)	۲۷ (۵۴)	

* مقدار P بر اساس مقایسه مجموعه نمونه های + و ++ در مقابل نمونه های +++ در دو گروه سرطانی و سالم بدست آمده است.



شکل۱.نمونه بافت سرطانی کولورکتال. سلولها به رنگ قهوهای یا آبی در آمده اند ولی بخش اعظم سلول ها به رنگ آبی می باشند(x ۴۰۰).
فلش شماره ۱ سلول قهوه ای وفلش شماره ۲ سلول آبی رنگ هستند.



شکل۲.نمونه بافت سالم کولورکتال. بخش اعظم سلول ها به رنگ قهوهای در آمده اند(x ۴۰۰).

فلش شماره ۱ سلول قهوه ای وفلش شماره ۲ سلول آبی رنگ هستند.

جدول (۳). بروز پروتیین *BRCA1* در آدنو کاسینومای موسینی و غیر موسینی

MA:Mucinous Adenocarcinoma

NMA:Non-Mucinous Adenocacinoma

بروز پروتئین *BRCA1*	نوع نمونه های سرطانی *MA*	 *NMA*	P-value
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	
+	۳(۳۷.۵)	(۲۳۸) ۱۰	۱
++	۳ (۳۷.۵)	(۴۲.۹) ۱۸	
+++	(۲۵) ۲	(۳۳.۳) ۱۴	

جدول (۴). ارتباط بروز پروتیین *BRCA1* در نمونه های سرطانی بامحل تومور

بروز پروتئین *BRCA1*	**محل تومور** کولون	 رکتوسیگموئید	P-value
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	
+	۹ (۲۵)	۴ (۲۸.۶)	۰/۵۰
++	۱۴ (۳۸.۹)	۷ (۵۰)	
+++	۱۳ (۳۶.۱)	۳ (۲۱.۴)	
جمع کل	۳۶	۱۴	

جدول (۵). ارتباط بروز پروتئین *BRCA1* در نمونه های سرطانی با جنس بیمار

بروز پروتئین *BRCA1*	**جنس بیمار**		P-value
	مرد تعداد(درصد)	زن تعداد(درصد)	
+	۷(۲۱.۲)	۶(۳۵.۳)	۰/۸۴
++	۱۴(۴۲.۴)	۷ (۴۱.۲)	
+++	۱۲(۳۶.۴)	۴(۲۳.۵)	
جمع کل	۳۳	۱۷	

جدول (۶). ارتباط بروز پروتئین *BRCA1* در نمونه های سرطانی با سن بیمار

بروز پروتئین *BRCA1*	**سن بیمار** ≤۵۹	 ≥۶۰	P-value
	تعداد(درصد)	**تعداد(درصد)**	
+	۵ (۲۷.۸)	۸ (۲۵)	۲
++	۵ (۲۷.۸)	۱۶ (۵۰)	
+++	۸ (۴۴.۴)	۸ (۲۵)	
جمع کل	۱۸	۳۲	

جدول (۷). ارتباط بروز پروتیین *BRCA1*در نمونه های سرطانی با*grade* تومور

بروز پروتئین *BRCA1*	*grade*			P-value
	G3	***G2***	***G1***	
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	
+	۳ (۶۰)	۷ (۵۰)	۳(۹.۷)	۰/۰۱۳
++	۱ (۲۰)	۶ (۴۲.۹)	۱۴ (۴۵.۲)	
+++	۱ (۲۰)	۱ (۷.۱)	۱۴ (۴۵.۲)	
جمع کل	۵	۱۴	۳۱	

Comparative expression of BRCA1 tumor suppressor protein in cancerous and normal colorectal specimens

Mehdi Nikbakht Dastjerdi*, vahid kashanian**

*Associate professor,Department of Anatomical Sciences & Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Islamic Republic of Iran, Post Code 81744-176

Tel:+98 311 792 2403

Fax:+98 311 792 2517

**Medical student, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Islamic Republic of Iran, Post Code 81744-176

.vhd2369@gmail.com

Abstract:

Introduction: The biological performance of BRCA1 is known in cancer and its prognostic significance was verified in colorectal cancer as the expression decrease of this protein in cancer indicates a poor prognosis for patients. Many different tumor suppressor genes play critical roles in colorectal cancer; among them, the role of BRCA1 tumor inhibitor gene is important and investigable. The aim of the current study was to evaluate the BRCA1 protein expression in cancerous colorectal specimens compare to juxtaposition normal tissue by immunohistochemistry method.

Materials and method: A total of 50 cancerous colorectal and juxtaposition normal tissue specimens were collected. The expression of BRCA1 protein was evaluated by immunohistochemistry method upon paraffin sections. The correlation between immunohistochemical findings and clinicopathological factors was investigated. The age, gender, and clinicopathologic presentation of the patients were noted.

Results: The findings of the current study showed that the level of BRCA1 protein expression compare to juxtaposition normal tissue, was significantly decreased in cancerous specimens (P= 0.026). There was statistically significant correlation between BRCA1 expression and grade of the tumor.

Conclusion: The expression of BRCA1 could be used as an appropriate biologic marker in diagnosis and prognosis of colorectal cancer.

Key Words: colorectal cancer, immunohistochemistry, BRCA1, tumor inhibitor gene